

Reference (d)

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-076399

(43)Date of publication of application : 23.03.1999

(51)Int.Cl.

A61M 1/36  
 A61M 1/14  
 C12N 15/09  
 // C12M 3/00  
 C12N 5/10

(21)Application number : 09-237145

(71)Applicant : FUJIMURA AKIO

(22)Date of filing : 02.09.1997

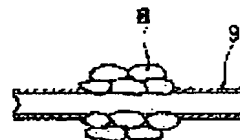
(72)Inventor : IMAI TADASHI  
 TSURUOKA SHUICHI

## (54) ARTIFICIAL ORGAN APPLYING SYSTEM ENGINEERING

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To make it possible to selectively discharge specific drugs and poisons by this artificial organ.

SOLUTION: The extracorporeal circulation type artificial organ is constituted to have a hollow fiber 9 stuck with cells. In such a case, the cells are phenotypic transformation cells 8 including recombination vectors contg. the genes relating to drug transportation.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

02.09.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3059127

[Date of registration]

21.04.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-76399

(43) 公開日 平成11年(1999) 3月23日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I
A 6 1 M 1/36	5 6 9	A 6 1 M 1/36 5 6 9
1/14	5 0 0	1/14 5 0 0
C 1 2 N 15/09		C 1 2 M 3/00 A
// C 1 2 M 3/00		C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 5/10		5/00 B
審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 6 頁)		

(21) 出願番号 特願平9-237145

(22) 出願日 平成9年(1997) 9月2日

(71) 出願人 59712:508

藤村 昭夫

栃木県河内郡南河内町祇園 1-29-5

(72) 発明者 今井 正

栃木県小山市城東 7-11-33

(72) 発明者 鶴岡 秀一

栃木県河内郡南河内町祇園 3-2-2 A  
-203

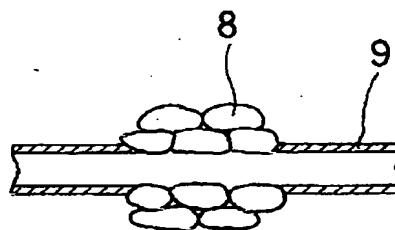
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】 組織工学を応用した人工臓器

(57) 【要約】

【解決手段】 細胞が付着したホローファイバーを備えてなる体外循環型人工臓器であって、前記細胞が薬物輸送に係る遺伝子を含有する組換えベクターを含む形質転換細胞である人工臓器。

【効果】 本発明の人工臓器によれば、特定の薬物、毒物をを選択的に排出することができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞が付着したホローファイバーを備えてなる体外循環型人工臓器であって、前記細胞が薬物輸送に係る遺伝子を含有する組換えベクターを含む形質転換細胞である人工臓器。

【請求項2】 宿主細胞が肝細胞である、請求項1に記載の人工臓器。

【請求項3】 宿主細胞が腎細胞である、請求項1に記載の人工臓器。

【請求項4】 遺伝子がジゴキシン及び／又はドキシソルビシンの輸送に係るものである、請求項1～3のいずれか1項に記載の人工臓器。

【請求項5】 遺伝子が多剤耐性遺伝子である、請求項1～3のいずれか1項に記載の人工臓器。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ホローファイバーを備えた体外循環型の人工臓器に関する。

【0002】

【従来の技術】肝臓は、物質代謝とその調節の大部分を担っており、糖質、タンパク質、脂質、核酸、ビタミン、ホルモンなどの代謝や、内因性・外因性物質の解毒、排泄等の生体に必要な複雑かつ膨大な機能を行う臓器である。劇症肝炎や術後肝不全などの急性肝不全は、肝再生までの一定期間の肝機能補助を行えば救命が可能と考えられる。しかしながら、肝臓は、上記のように複雑かつ膨大な機能を担う臓器であることから、純粋な人工的手法による人工肝臓で肝機能補助を行うのは困難である。これに対し、表面に肝機能の主体である肝細胞を付着させたホローファイバーを備えたハイブリッド型の人工肝臓が提案されており、これは、体外循環への適用に有利である(葛西真一、澤雅之ら、腹救診11, 827, 1991、戸部成四郎、武井由香ら、人工臓器21, 1045, 1992、竹下和良、石橋治昭ら、人工臓器22(1), 153, 1993、特開平9-56814号公報等参照)。

【0003】また同様に、腎不全などで生体機能が低下した場合に、腎臓が排出すべき老廃物を血液中から除去するのに用いるホローファイバー型の人工腎臓も提案されている。

【0004】ところで、癌患者に対して抗がん性抗生物質を投与するなど、薬物を投与することによる化学療法は盛んに実施されているが、薬物は副作用を発現しやすいので選択的に体外に排出させたほうがよい場合がある。また、治療目的以外に何らかの毒物を誤って摂取してしまった場合などに、その毒物を選択的に体外に排出させたい場合もある。したがって、そのような薬物、毒物を選択的に排出することができるシステムの開発が望まれている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、薬

物、毒物を選択的に排出することができるホローファイバー型の人工臓器を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、特定の薬物の輸送に係る遺伝子を導入した形質転換細胞をホローファイバーの外表面に付着させてホローファイバー内部にその薬物を含む液を灌流させると、その薬物が選択的に前記細胞により輸送されることを見出し、本発明を完成した。

【0007】本発明は、細胞が付着したホローファイバーを備えてなる体外循環型人工臓器であって、前記細胞が薬物輸送に係る遺伝子を含有する組換えベクターを含む形質転換細胞である人工臓器である。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において、薬物輸送に係る遺伝子としては、例えば、有機アニオン輸送体に係る遺伝子(この遺伝子のクローニングについてはKanai N., Lu R., Satriano J. A., Bao Y., Wolkoff, A.W. and Schuster V.L., "Identification and characterization of a prostaglandin transporter", Science(Wash)268:866-9(1995)参照)、有機カチオン輸送体に係る遺伝子(この遺伝子のクローニングについてはLopez-Nieto-CE, You-G, Bush-KT, Barros-EJ, Beier-DR and Nigma-SK, "Molecular cloning and characterization of NKT, a gene product related to the organic cation transporter family that is almost exclusively expressed in the kidney", J. Biol. Chem. 272(10), 6471-8(1997)参照)、ペプチド輸送体に係る遺伝子(この遺伝子についてはBoll-M, Herget-M, Wagener-M, Weber-WM, Markovich-D, Biber-J, Clauss-W, Murer-H and Daniel-H, "Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1996 Jan 9, 93(1), 284-9参照)等が挙げられる。その他、水チャネルに係る遺伝子(この遺伝子のクローニングについてはFushimi-K, Uchida-S, Hara-Y, Hirata-Y, Marumo-F and Sasaki-S, "Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule", Nature, 361(6412), 549-52(1993)参照)、チトクロムP450に係る遺伝子(この遺伝子についてはEmi-Y, Chijiwa-C and Omura-TA, "different cytochrome P450 form is induced in primary cultures of rat hepatocytes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990Dec, 87(24), 9746-50参照)等も使用可能である。具体的には、ジゴキシン及び／又はドキシソルビシンの輸送に係るヒト多剤耐性遺伝子MDR-1(この遺伝子のクローニングについてはKioka N., Tsubota J., Kakehi Y., Komano T., Gottesman MM., Pastan I. and Ueda K., "P-glycoprotein

n carries Gly185 with an altered pattern of multi drug resistance", Biochem. Biophys. Res. Commun., 162, 224-231(1989)参照)が好適に使用される。

【0009】上記遺伝子を含む組換えベクターの作成及びその組換えベクターによる形質転換細胞の作成は、例えば以下のようにして行うことができる。上記遺伝子を組み込むベクターとしては、例えば、発現プラスミドpHIR(社製)、pbluescript(Stratagene社製)等が挙げられる。組換えベクターはpHMAIRESneo(Mets et al. Virology(1996)217:230-241)をもとに植田らがMDR-1を組み入れたものである(Taguchi et al., Biochemistry 36:883-889(1997)参照)。

【0010】本発明において、宿主細胞としては、肝細胞、腎細胞等が挙げられ、その他、線維芽細胞、心筋細胞等も使用可能である。初代培養のこれらの細胞にSV40 large T antigenを導入し不死化して作成する。導入の方法はエレクトロポレーション又はリポフェクションによる。

【0011】本発明において、形質転換細胞を付着させるホローファイバーとしては、従来から人工腎臓、人工肝臓等として用いられている多孔性のものを用いることができる。ホローファイバーの材質としては、例えば、親水性ポリオレフィン、キュブラアンモニウムレーヨン等が挙げられる。また、ホローファイバーの膜厚は、通常、5~70 $\mu\text{m}$ であり、好ましくは10~50 $\mu\text{m}$ である。また、膜の内径は、通常、100~400 $\mu\text{m}$ であり、好ましくは180~330 $\mu\text{m}$ である。さらに、孔径は、通常、0.01~3 $\mu\text{m}$ であり、好ましくは0.1~0.3 $\mu\text{m}$ である。本発明の人工臓器におけるホローファイバーの膜面積は、通常、150~300 $\text{cm}^2$ であり、好ましくは160~200 $\text{cm}^2$ である。

【0012】図1は、本発明による人工臓器の一実施例を示すものである。図1において、円筒状のハウジング1の両開口端には、上流側蓋体2及び下流側蓋体3が設置されている。上流側蓋体2には血液流入口4が、下流側蓋体3には血液流出口5がそれぞれ設けられている。また、ハウジング1には、液体流入口6と液体流出口7が設けられている。さらに、ハウジング1の内部には、ホローファイバーが多数配設されている。これらのホローファイバーの両端は、それぞれ一つに纏められて血液流入口4、血液流出口5に連通されている。ハウジング1の内部で、かつホローファイバーの外側の空隙(ファイバー外空隙)は、ハウジング1に設けられた液体流入口6と液体流出口7に連通している。

【0013】図2は、ハウジング1内に多数配設された、外表面に形質転換細胞8が付着したホローファイバーのうちの1本のホローファイバーの拡大断面図である。ホローファイバー9の外表面には、多数の形質転換細胞8が付着している。図1に例示した本発明の人工臓器によれば、ファイバー内に流入した血液中の特定

の薬物は、ファイバーの孔を通過し、形質転換細胞8によって選択的に輸送されてファイバー外空隙に移動する。また、その際、ファイバー外空隙にリン酸バッファー等を流しておくことにより、移動された薬物をハウジング外に排出させることができる。

【0014】図3は、図1及び2に示した本発明の人工臓器を製造する装置の全体の概略を示す図である。この装置には、形質転換細胞が付着されていないこと以外は図1と同様のホローファイバーを内包するホローファイバー型モジュール10と、培地等を入れておくボトル11と、ペリスタルティックポンプ12と、細胞懸濁液等を注入するためのシリンジ13と、空のシリンジ14とを備えている。前記のホローファイバー型モジュールとしては、例えば高密度細胞培養システムCultureflo G(旭メディカル株式会社製)等を用いることができる。また、この装置を作成するにあたっては、ホローファイバー型モジュールとチューブ等が一体化された高密度細胞培養ユニットCultureflo TC-50(旭メディカル株式会社製)等を利用することもできる。

【0015】本発明の人工臓器の製造は、例えば、図3に示したような装置をインキュベーター内に入れて行う。まず、ボトル11に培養液を入れ、この培養液をペリスタルティックポンプ12を用いて循環させる。次いで、細胞懸濁液の入ったシリンジ13をセットして細胞懸濁液をファイバー外空隙に注入し、シリンジ12とシリンジ13を交互に押して細胞を空隙内に分散させる。培養液を、通常、0.5~10 $\text{ml}/\text{分}$ 、好ましくは0.5~2 $\text{ml}/\text{分}$ で循環させながら培養を行う。培養は、通常、36~38 $^{\circ}\text{C}$ の温度で行う。また、培養時間は、通常、24~240時間である。

【0016】上記のようにして、外表面に形質転換細胞が付着したホローファイバーを備えてなる本発明の人工臓器を製造することができる。ファイバー外空隙における該細胞の密度は、肝細胞の場合、通常、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{11}$ 個/ $\text{ml}$ であり、好ましくは $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 個/ $\text{ml}$ である。腎細胞の場合、通常、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 個/ $\text{ml}$ であり、好ましくは $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ 個/ $\text{ml}$ である。一般の透析膜による透析、血液吸着では生体に必要な(例えばアルブミン)の排泄が起こるという大きな問題があった。しかし、このシステムでは除去したいものだけを自由に選べるという大きな利点がある。また、アンチセンスを導入すればこの細胞の輸送するもの(例えばPAH)を輸送しないようにすることも可能である。

【0017】また、本発明は、外表面に形質転換細胞を付着させたホローファイバーを備えた人工臓器に限られず、内表面に形質転換細胞を付着させたホローファイバーを備えた人工臓器をも含むものであり、その場合、ホローファイバー外空隙に血液を灌流させ、排出させたい薬物をファイバー内に移動させてリン酸バッファー等と

ともに排出することもできる。

【0018】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例の範囲に限定されるものではない。

【実施例1】

ヒト多剤耐性遺伝子を含有する組換えベクターを含む形質転換細胞が付着したホローファイバーを備えた人工臓器の作成

(1) ウサギ近位尿管培養細胞PTCLの作成

体重1~2 kgの雄性または雌性Japanese White rabbit(日本白兎)を、ペントバルビトール又はエーテルにより麻酔した後、その腎臓を取り出した。次いで、実体顕微鏡下でその腎臓からピンセットを用いて近位尿管(約1mm)を数本単離し、培地(1:1(v/v)のDulbecco's modified Eagle培地とHAM F-12、及び10%ウシ胎児血清を含む)中に入れた。これを、37℃、5%CO<sub>2</sub>のインキュベーター中で細胞数が約1×10<sup>6</sup>になるまで培養して、初代培養細胞を得た。次に、得られた初代培養細胞に、上記培地の代わりにウシ胎児血清フリーの培地を添加し、SV40ラージT抗原及びネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドp-SVneo3(1μg/ml、Bethesda laboratory製)5μlをリボフェクチン(GIBC製)5μlとともに添加し、24~48時間培養した。次いで10%ウシ胎児血清、及びネオマイシン40μg/mlを含む培地に変え、そのまま培養を続けた。このようにしてネオマイシン耐性の細胞株PTCLを作成した。

【0019】(2) ヒト多剤耐性遺伝子(MDR-1)のPTCLへの導入

発現プラスミドp-HIRのマルチクローニングサイトにヒトMDR-1を入れ、ネオマイシンを加えることで選択し、MDR-1を含有するプラスミドベクターp-HIRMDR1を調製した。即ち、このプラスミドベクターp-HIRMDR1はpH aMAIRESneo(Mets et al Virology(1996)217:230~241)をもとに植田らがMDR-1を組み入れたものである(Taguchi et al, Biochemistry 36:8883~8889(1997)参照)。

【0020】得られたプラスミドベクターp-HIRMDR1と上記で得られたPTCLをエレクトロポレーション用容器に入れて下記のようにしてp-HIRMDR1をPTCLに導入した。PTCL 2×10<sup>6</sup>個/30μl培地にpHIRMDR1 10μg/10μlを混ぜBioRad社ジーンパルサーを使用500V30μsecの電圧をかける。これを再度DMEM/HAMF-1210%FBSに混ぜ300μg/mlコルヒチンと共に培養を行う。これによりコルヒチン耐性、つまりMDR-1をつよく発現した細胞のみが培養できる。このようにして得られた形質転換細胞PTCL(p-HIRMDR1)を、培地(DMEM/HAMF-12 10% FBS)と混合して、37℃で1×10<sup>6</sup>細胞になるまで培養した。これを細胞懸濁液とした。

【0021】(3) PTCL(p-HIRMDR1)のホローファイバーでの培養

図3に示した装置を用いてPTCL(p-HIRMDR1)の培養を行った。なお、この装置は、旭メディカル株式会社製の高密度細胞培養ユニットCultureflo T/C-50(ホローファイバーの材質 新水性ポリオレフィン、ホローファイバーの膜厚:50μm、ホローファイバーの膜の内径:330μm、孔径:0.3μm、ホローファイバーの有効長:80mm、ホローファイバーの数:150本、ホローファイバーの膜面積:160cm<sup>2</sup>、ホローファイバー外容積:2ml、ホローファイバー内容積:0.1ml)を利用して作成した。

【0022】まず、ボトル11として、リン酸バッファー入りのボトルを接続し、リン酸バッファーをペリスタルティックポンプ12を用いて流量10ml/分で1時間循環させた。また、シリンジ13としてリン酸バッファーの入ったシリンジを接続してファイバー外空隙にもリン酸バッファーを10ml注入した。次に、装置をインキュベーターに入れ、リン酸バッファーボトルを培地(DMEM/HAMF-12 10% FBS)入りのボトルに変えて、培地を流量10ml/分で48時間循環させた後、汚染のないことを確認した。また、ファイバー外空隙もリン酸バッファーに変えて培地を入れ、数回培地の交換を行った。

【0023】次いで、培地の循環を止め、シリンジ13として上記(2)で得られた形質転換細胞懸濁液の入ったシリンジを接続して、該細胞懸濁液をファイバー外空隙に注入し、シリンジ12とシリンジ13を交互に押して細胞を空隙内に分散させた。このまま、培地を循環させずに37℃で30分間放置した。その後、ポンプ12を超低速から作動させ、6時間かけて流量2ml/分まで高めて、48~72時間培養を行った。このようにして、ホローファイバーの外表面に形質転換細胞が多数付着したホローファイバーを備えた、図1に示したような人工臓器を作成した。

【0024】【実施例2】

インビトロでの本発明の人工臓器の薬物輸送能の評価  
上記(3)で作成した、図1に示した本発明の人工臓器を用いてジゴキシンの輸送能を評価した。図4に、本実施例で用いた試験装置を示す。1:1(v/v)のDulbecco's modified Eagle培地とHAM F-12及び10%ウシ胎児血清を含む培地と、所定の濃度のジゴキシンの(7.25ng/ml、5.85ng/ml、及び4.05ng/mlの3種類の濃度で試験を行った)と、パラアミノ馬尿酸2μg/mlと、イヌリンの1μg/mlとの混合溶液50mlの入った容器15を、シリンジポンプを介して人工臓器10の血液流入口4に接続した。シリンジポンプ16を用いて流量1ml/時間で混合溶液を人工臓器に灌流させた。そして、回収容器17に灌流液を採取し、各薬物の30分間の排出量を測定した。また、50時間後に、MDR-1の遮断薬であるベラパミルを容器15に添加して灌流させ、回収容器17に採取した灌流液中の各薬物の濃度を測定した。

【0025】また、比較例として、遺伝子MDR-1を導入していない腎細胞を付着させたホローファイバーを備えたる人工臓器を用いて上記と同様の試験を行った(MD

R(-)。

【0026】各試験における灌流液中のジゴキシンの中空糸内から外への輸送量  $J_{\text{digoxin}}$  (ng/30min) の変化を図5の(A) に示す。また、混合溶液中のジゴキシンの濃度が4.05ng/ml の場合の、灌流液中のバラアミノ馬尿酸の中空糸内から外への輸送量  $J_{\text{PHA}}$  ( $\mu\text{g}/30\text{min}$ ) と、イヌリンの濃度  $J_{\text{inulin}}$  ( $\mu\text{g}/30\text{min}$ ) の変化を、それぞれ図5の(B)、(C) に示す。これらの結果から、PTCL(p-HIRMDR1) は、ジゴキシンを選択的に輸送するということがわかる。

【0027】〔実施例3〕本実施例において、ジゴキシンの代わりにドキソルビシン(ADM)を6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 用いた以外は実施例2と同様にして試験を行った。各試験における灌流液中のADMの輸送量  $J_{\text{ADM}}$  (ng/30min) の変化を図6の(A) に示す。また、灌流液中のバラアミノ馬尿酸の輸送量  $J_{\text{PHA}}$  ( $\mu\text{g}/30\text{min}$ ) と、イヌリンの濃度  $J_{\text{inulin}}$  ( $\mu\text{g}/30\text{min}$ ) の濃度の変化を、それぞれ図6の(B)、(C) に示す。これらの結果から、PTCL(p-HIRMDR1) は、ADMを選択的に輸送するということがわかる。

【0028】

【発明の効果】本発明の人工臓器によれば、特定の薬物、毒物をを選択的に排出することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による人工臓器の一実施例を示す図である。

【図2】外表面に形質転換細胞が付着したホローファイバーの拡大部分の断面図である。

【図3】本発明による人工臓器を製造する装置の全体の概略を示す図である。

【図4】実施例で用いた、本発明による人工臓器の試験装置を示す図である。

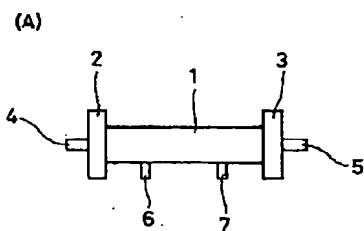
【図5】実施例2におけるジゴキシンの輸送量  $J_{\text{digoxin}}$ 、バラアミノ馬尿酸の輸送量  $J_{\text{PHA}}$  及びイヌリンの輸送量  $J_{\text{inulin}}$  の変化を示す図である。

【図6】実施例3におけるADMの輸送量  $J_{\text{ADM}}$ 、バラアミノ馬尿酸の輸送量  $J_{\text{PHA}}$  及びイヌリンの輸送量  $J_{\text{inulin}}$  の変化を示す図である。

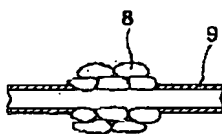
【符号の説明】

1…ハウジング、2…上流側蓋体、3…下流側蓋体、4…血液流入口、5…血液流出口、6…液体流入口、7…液体流出口、8…形質転換細胞、9…ホローファイバー、10…人工臓器、11…ボトル、12…ポンプ、13…シリリンジ、14…シリリンジ、15…容器、16…ポンプ、17…回収容器

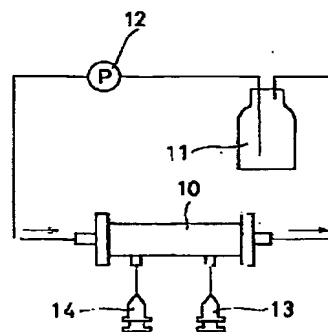
【図1】



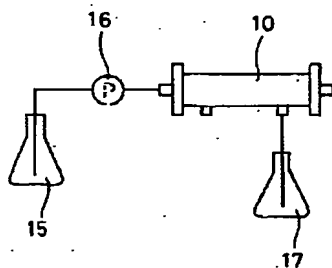
【図2】



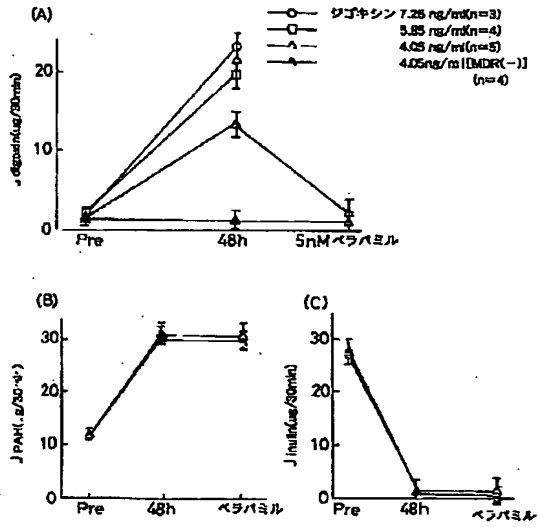
【図3】



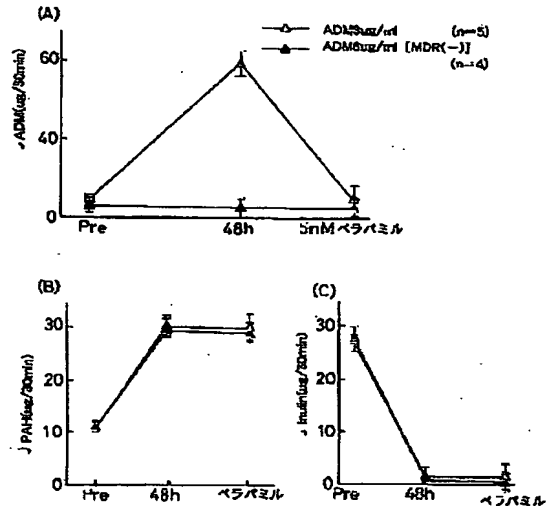
【図4】



【図5】



【図6】





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**